

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Cell immobilization / preservation liquid characterized by containing a methyl cystine as mucolysis nature.

[Claim 2] Cell immobilization / preservation liquid given in the 1st term of a patent claim characterized by the content of a methyl cystine being 0.1 – 0.2%.

[Claim 3] Cell immobilization / preservation liquid given in the 1st term of a patent claim characterized by furthermore containing a silicon nature defoaming agent.

[Claim 4] Cell immobilization / preservation liquid given in the 3rd term of a patent claim characterized by the content of a silicon nature defoaming agent being 10–30 ppm.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-46101

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)5月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48	P			
33/50	X			

発明の数 1 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願昭61-311819	(71) 出願人	999999999 高浜 素秀 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学第二病理学教室内
(22) 出願日	昭和61年(1986)12月30日	(71) 出願人	999999999 丸木 清美 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学理事長室内
(65) 公開番号	特開昭63-168563	(72) 発明者	高浜 素秀 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉医 科大学第二病理学教室内
(43) 公開日	昭和63年(1988)7月12日	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 審査官 吉田 禎治
		(56) 参考文献	特開 昭61-80046 (J P, A) 特開 昭62-217158 (J P, A) 特公 昭49-16609 (J P, B 1)

(54) 【発明の名称】 粘液溶解性を具備した細胞固定・保存液

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粘液溶解性としてメチルシスチンを含有することを特徴とする細胞固定・保存液。

【請求項2】 メチルシスチンの含有量が0.1~0.2%であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の細胞固定・保存液。

【請求項3】 さらにシリコン性消泡剤を含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の細胞固定・保存液。

【請求項4】 シリコン性消泡剤の含有量が10~30ppmであることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の細胞固定・保存液。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は細胞固定・保存液に関し、特に粘液性の細胞診

2

検体の固定及び保存に好適な、粘液溶解性を具備した細胞固定・保存液に関する。

【従来の技術】

喀痰や子宮腔部から綿棒で採取された粘液性の検体中には無数の細胞が含まれており、その中に前癌状態の異型細胞や癌細胞が含まれていないかどうかを検査するのが細胞診であり、この細胞診は、現代の癌の早期発見に重要な役割を担っている。この細胞診には顕微鏡が用いられてきたが、近年はそれに加えて、細胞を秒速数百個またはそれ以上のスピードで流して測定するところの自動細胞分析・分離装置でありフローサイトメトリー (flow cytometry) を用いて行う自動化細胞診も適用されようとしている。顕微鏡あるいはフローサイトメトリーを用いた細胞診のいずれの場合でも、細胞が正確に診断されるためには、検体中の細胞が良好な状態に固定される

3

ことが極めて重要で、固定が不良の場合は、癌細胞が見落とされたり、逆に癌細胞でないものが癌細胞と見誤られたりする。

細胞診の検体の一般的な固定法は、検体をスライドグラスに直接塗抹してそれが乾かぬうちに迅速に固定液に入れて固定する方法（塗抹標本の湿潤固定法）がとられ、その固定液としては95%エタノールが用いられる。しかし、入院していない患者や集団検診の被検者について肺癌の喀痰細胞診を行う場合は、病院を受診した際に直ちに痰が喀出できるとは限らない。むしろ痰は起床時に出やすく、またこの起床時の痰は、就寝中に肺内から遊離した細胞を豊かに蓄えているので細胞診に最も適している。この起床時の痰を病院に持参した後に固定を行うのでは時間が経ち過ぎ、細胞に変性が加わっていて固定が不良であり、細胞診が不正確となる。このような場合、適切な喀痰用の細胞固定液があって細胞を直ちに固定できれば、起床時の喀痰を自宅でその固定液に入れて保存し、後日病院に持参出来るので好都合である。しかし、喀痰を95%エタノール固定液に入れると、喀痰の粘液が表層から凝固し、凝固した表層は、固定液が内部へ浸透するのを妨害して内部の細胞の固定を不良とするばかりでなく、喀痰をスライドグラスに薄く延ばして塗抹することを妨げて更に標本の質を悪くする。また、フローサイトメトリーによる自動化細胞診の場合には、細胞の固定状態が不均一なために測定誤差が大きくなったり、凝固した粘液塊が装置のノズルを詰らせて分析不能となるなどの重大の支障を生ずる。

肺癌検診のために、喀痰用の固定液を最初に導入したのは米国のサコマノ（Saccomanno, 1963）であり、我が国においても、このサコマノ液がしばしば用いられている。このサコマノ液は、50%エタノール水にカーボワックス（ポリエチレングリコール1540）が2%の割りに添加された簡単な組成のものである。この液の中に喀痰を吐き出して一定時間固定したあと、検査室においてブレンダーにかけて強く攪拌して粘液を機械的に破壊して細胞を遊離させ、遊離した細胞を遠心沈澱して収集し、これをスライドグラスに塗抹して塗抹標本を作り、染色を施して顕微鏡診断を行うことになる。この液は、エタノール濃度が50%と少し高い上にカーボワックスを含むため、固定中に細胞の収縮や核の濃縮が起り、そのため細胞の詳細な内部構造が読み取り難く、慣れないと細胞診断に支障を来す欠点がある。また、フローサイトメトリーによる自動化細胞診においては、この液が粘液溶解剤を含まないために、溶けずに残っている粘液が装置のノズルを詰らせて測定が不能となったり、また細胞集塊が生じ易いために、細胞一個一個の測定が不能となるなどの重大な支障をきたす。従って、このサコマノ液は、フローサイトメトリーによる自動化細胞診にとっては特に不適切な固定液である。

近年、我が国において、粘液溶解性の喀痰用固定液が開

4

発されて市販されるようになったが、これらはいずれもサコマノ液と同様に2%のカーボワックスを含む50%エタノール水を基本とし、粘液溶解剤を添加したものである。粘液溶解剤として、東北大学抗酸菌研究所（サーマル社発売）はNアセチル-Lシスチン（N-acetyl-L-cysteine）を用い、大阪府成人病センター（松浪ガラス社発売）はジチオトレイトール（dithiotreitol）を用い、またYM式喀痰固定液（武藤純薬社製、特許出願中）はジハイドロキシジチオールブタン（dihydroxy dithiolbutan）や酵素を加えたものとされている。

〔本発明が解決しようとする問題点〕

近年、肺癌患者の急増に関連して喀痰細胞診への需要も急増し、老人医療法の改正によって昭和62年度から成人の肺癌検診が義務付けられることになると、喀痰細胞診への需要増加にさらに拍車がかかる情勢である。しかし、肺癌検診のための喀痰細胞診は、子宮癌検診の細胞診に比べて、正常細胞の数が著しく多くて異常細胞の含有率は少ない特徴のために、顕微鏡による診断は著しく労力がかかる作業である上、この技術に習熟した細胞診士や指導医の数も少ない。そこで労力節減のため、近年は、フローサイトメトリーを用いた自動化細胞診の開発が強力に推進されている。これは、バラバラにした細胞を蛍光染色して溶液中に浮遊させておき、この細胞を装置の中を高速で流しながらレーザー光線を当てて蛍光を発色させ、細胞一個ずつからの蛍光量を測定して細胞を定量するものであるから、喀痰などの粘液性の検体の場合はその粘液を溶解し、細胞を分散した浮遊状態として固定（浮遊固定）し得る固定液が不可欠である。また、集団検診において多数被検者の喀痰をそれぞれ固定液に入れて回収する場合は、通常は数日間は固定液に入れたまま保存されることが多いので、この間に細胞の変性が進行する危険もある。そのような場合に、細胞の固定性と共に細胞構造の保存性も良好な固定・保存液が望まれる。そのような液があれば、肺癌の集団検診にも便利に利用出来るし、また子宮癌についての集団検診においても、検診医は、綿棒を一つその場でスライドグラスに塗抹をせずとも、綿棒を固定液に投入しておけばよいので手間も省け、かつ塗抹時に起り易い塗抹標本の乾燥という重大の障害からも逃れることが出来て好都合である。細胞の固定・保存性の良否は細胞の診断精度に重大な影響を及ぼし、これが不良の検体では診断が不能となったり、誤診が生じたりするので、細胞診を担当する関係者には非常に関心が高い。このような細胞の固定・保存液に関して要求される事項を纏めると以下の通りである。

1. 粘液溶解性：

検体中の粘液は、一般に固定液に触れると凝固し、凝固した粘液は、固定液の粘液塊内浸透を阻害して細胞の固定を不均等として細胞分析上の誤差を生み、また粘液塊がフローサイトメトリーのノズルを詰らせて分析を不能

10

20

30

40

50

とする。従って、固定中に粘液が溶解される固定液が望まれる。

2.DNAと蛋白質の固定：

顕微鏡による診断に際しては、核の大きさやその内部構造、および核／細胞質比が診断の対象となり、またフローサイトメトリーによる自動化細胞診に際しては、核のDNA量および細胞のDNA量／蛋白量比が定量の対象となるので、核（DNA）と細胞質（蛋白質）との両者が共に良く固定され、かつ保存されなければならない。

3.固定による細胞の収縮や凝集の防止：

細胞の固定は確実でなければならないが、固定を強化すると、細胞が収縮あるいは濃縮して顕微鏡的診断が困難になったり、また細胞同士が凝集して細胞集塊を作り、これがフローサイトメトリーのノズルを詰らせて測定が不能になったりするので、固定の強度はほどほどでなければならない。

4.固定液の毒性：

肺癌の集団検診の際は、喀痰の固定液を容器に入れて被検者に配布することになるが、家庭に配布された固定液を誤って子供などが飲むという万一の事故を考慮すると、その固定液の毒性は低くなければならない。

5.固定した細胞の保存性：

集団検診の際は、大量の検体が一時に集められ、これらが順次検査されるので、その間の数日から2週間ぐらひは固定液の中で細胞構造が保存されねばならない。

近年わが国で市販されている各種の喀痰固定液を検討したが、0.2%アセチルシスチンを50%エタノール水に添加した東北大学抗酸菌研究所式の固定液は、追試の結果、粘液溶解性は良好であるが、本出願者がフローサイトメトリーによる自動化細胞診用に開発したDNA蛋白同時定量用蛍光染色液の成分であるヘマトポルフィリンエーアセチルシスチンとが反応を起して褐色の絮状沈澱物を生じ、該染色液による染色が障害されることが欠点であった。次にジハイドロキシジチオールブタンを用いたYM喀痰固定液（武藤純葉株式会社製、特許出願中）を検討したが、これは粘液溶解性の点ではNアセチルシスチン使用の固定液と同等と思われたが、独特の悪臭があり、痰を吐きだそうとして口を容器に近づけると、卵が腐ったような悪臭が鼻をつく。ある地域の集団検診で、これを配られた被検者のうちには、この固定液の悪臭から固定液が腐っていると思い、固定液を捨てたものがいたとする報告も伝えられた。またジハイドロキシジチオールブタンの毒性が不明な点、酵素を用いているので約3カ月の有効期間しかなく高価であるなどの点にも問題がある。ジチオトレイトールを用いた大阪成人病センター式の喀痰固定液については今回は実験していないが、ジチオトレイトールはNアセチルシスチン同様去痰剤として用いられる薬物であり、使用量も少ないので毒性面では問題がないものと思われるが、高価である点、価格面での問題がある。

本発明は、上述のような欠点の無い、粘液溶解性を具備した細胞固定・保存液を提供することを目的とする。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者は、フローサイトメトリーと細胞の蛍光染色による細胞診の自動化を開発している途上に、当該染色液と反応しない粘液溶解剤を種々検討した結果、メチルシスチンを見出した。メチルシスチン塩酸塩は、化学的にはメチルβ-メルカプトアラニン塩酸塩（methylβ-mercaptoalanine hydrochloride）、 $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOCH}_3 \cdot \text{HCl}$ であり、かつては去痰剤として用いられたことがある。多数の患者の喀痰を用いて検討の結果、固定液にメチルシスチンを0.1～0.2%添加したものでは、粘液がよく溶け、細胞固定効果も良好で、固定液に特に悪臭もなく、また長期の保存にも変質や効力減退を示さなかった。

また、粘液溶解剤のメチルシスチンは、去痰剤としても用いられる薬物であり、本固定液に用いられる量がごく僅かなので毒性面からは問題にならない。

即ち、本発明は粘液溶解剤として、メチルシスチンを含有することを特徴とする細胞固定・保存液であり、これは喀痰のような粘性の細胞診検体の固定・保存液として利用価値が高いものであり、また、用いる粘液溶解剤が蛍光染色を阻害しない特徴もあるので、フローサイトメトリーと細胞蛍光染色法とを用いた自動化細胞心にも適している。

固定・保存液の主剤及び他の成分は特に限定されないが、本発明者が新たに見出したエチルアルコールと食塩と蔗糖又はプロピレングリコールのいずれか一方を含む緩衝液を用いれば、細胞の収縮や凝集を引き起こさず細胞診に適した状態に核及び細胞質を固定しうる固定・保存液とすることができる。そのような固定・保存液の例としては0.8～0.9%の食塩を含む0.01モル磷酸緩衝液（0.01モル磷酸緩衝生理的食塩水、phosphate buffered saline solution）（以下、PBSと略称）にメチルシスチンを0.2%、蔗糖もしくはプロピレングリコールを2%、水溶性アンチフォームを10ppm、エタノールを40%、それぞれ最終濃度になるように加えたものがある。さらに、フローサイトメトリーによる分析の際には、粘液溶解と細胞分散の目的で、検体を入れた固定液を高速ブレンダーで激しく振盪するが、その層に無数の細かな気泡が生じ、これが粘液塊を覆ったり粘液塊の中にとじこめられたりして粘液と粘液溶解剤との接触を妨害するので、シリコンレジン製剤であるアンチフォームを消泡剤として加え、良い結果を得た。シリコンレジン消泡剤として、ビール、ブドー酒、しょうゆ、乳製品、果物ジュースなどの各種の食品の濃縮、発酵、および蒸溜工程などに用いられ、作業の能率化や製品の均一化などに役立っており、食品中の本品の残留量は50ppm以下と定められている。実験の結果、シリコンレジンの消泡作用は10ppmで充分に発現し、30ppm以上ではシリコンレジン

の不溶解部分が残るので無駄であった。

本固定液の使用法

喀痰の固定の場合は、喀痰を本固定液中に吐き出したあと、手でよく振盪しておく。2日～1週間の固定の後、高速ブレンダーで約2分間振盪し、遠心沈澱し、顕微鏡標本作成の場合は、残渣をピペットでスライドガラスに移し、一昼夜乾燥した後、95%エタノールまたはスプレー式により再固定を行う。フローサイトメトリーによる自動化細胞診の場合は、残渣を1回磷酸緩衝液で洗浄したのち、蛍光染色を施して分析を供する。

〔実施例〕

実験例1 喀痰の粘液溶解剤のメチルシステインの濃度を定める実験：

喀痰の粘液溶解のための固定液に添加する粘液溶解剤メチルシステインの適正濃度を知るため、30%エタノール・PBSに、メチルシステインを0、0.05、0.1、0.2、0.5%それぞれ添加したものを準備し、これに患者の喀痰を入れ、室温で3日間放置したものを手で約20分間振盪し、粘液の溶解性を目で観察した。

〔結果〕メチルシステインの濃度が0および0.05%のものでは粘液の溶解は不十分で（第1図）、0.1%以上の濃度で粘液溶解が発現した（第2図）。

第1図の写真はメチルシステインを添加しない固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）である。

画面の下1/3に横に走る線条は粘液で、これに細胞がからめられていて、分散していない。

第2図の写真はメチルシステインを0.2%添加した固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）である。

粘液が溶解して、細胞は良く分散している。ひときわ大型の細胞は肺癌細胞である。

実験例2 固定液の消泡剤として添加するシリコン製剤の効果を見る実験：

固定液に固定した喀痰は、その粘液溶解と細胞分散の目的のため、容器ごと高速ブレンダーにかけて毎分約6000回の振動を与えるが、この際に固定液が強く泡立ち、この気泡が喀痰の周囲を取り巻き、固定液との接触を妨害する。そこでシリコン製剤の消泡剤を用いることにし、その商品であるアンチフォームを食品添加剤として認可されている濃度以下の10ppm添加した固定液（2%蔗糖を添加した30%エタノール・PBS）と、アンチフォームを添加していない固定液とを準備し、これらに喀痰を入れて高速ブレンダーにより2分間振盪したところ、アンチフォームを添加したものが明らかに気泡の発生が少なく、また消泡も速く、粘液溶解も優れていた。

実施例 固定液（0.2%メチルシステイン、2%プロピレングリコールおよび10ppmアンチフォームを含有した40%エタノール・PBS）（固定液に喀痰を吐き出すと、唾液が加わって固定液のエタノール濃度が薄まるので、エ

タノール濃度は4%とした）の喀痰の粘液溶解性、細胞凝集性および細胞固定効果を見る実験：

完成した固定液の総合的な効果をみるため、126名の患者の喀痰につき、喀痰を入れた直後にこれを手で振盪した時と3日後に高速ブレンダーで振盪した場合の喀痰溶解性、細胞の分散および固定効果などの検討した。（表1）

〔結果〕高速ブレンダーで振盪後は、1例の喀痰を除き、粘液溶解が認められた。粘液溶解が不能であった1例は、高度に血性であったために血液が粘液をまき込んで凝固したものであった。また、顕微鏡所見上、細胞の分散は良好で、細胞質および核の構造は1カ月以上保存したものでも優れていた（第3～第6図）。

表1 完成した本固定液で固定した126例の喀痰の溶解性の記録。

	容器を手で振盪	容器を高速ブレンダー振盪
完全溶解	98(78%)	119(94%)
不完全溶解	26(21%)	6(5%)
溶解しない	2(1%)	1(1%)

第3～6図の写真は完成した本固定液で固定し、40日間冷蔵庫で保存された喀痰中の肺癌細胞の顕微鏡写真（400倍）である。細胞質も核もその構造が極めてよく保たれている。第3図と第4図は肺の扁平上皮癌細胞の写真で、第5図と第6図は肺の肺癌細胞の写真である。

〔発明の効果〕

以上述べたように、本発明によれば細胞固定・保存液において粘液溶解剤としてメチルシステインを用いることにより、喀痰等の粘性性検体の細胞診における細胞固定の際に、粘液の溶解が良好であって細胞が分散した浮遊した状態として固定することができ、また、悪臭もなく毒性の点でも問題のない固定・保存液を提供しうる。さらに、フローサイトメトリーと細胞蛍光染色を用いた自動化細胞診において、粘液溶解剤が蛍光染色を阻害しないという効果も有する。

〔図面の簡単な説明〕

第1図はメチルシステインを添加しない固定液（30%エタノール・PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）。

第2図はメチルシステインを0.2%添加した固定液（30%エタノール/PBS）で固定した喀痰の塗抹染色標本の顕微鏡写真（100倍）。

第3～6図は、本発明固定液で固定し、40日間冷蔵庫で保存された喀痰中の肺癌細胞の顕微鏡写真（400倍）。

第3図と第4図は肺の扁平上皮癌細胞の写真で、第5図と第6図は肺の腺癌細胞の写真。

(5)

特公平7-46101

【第1図】



【第2図】



(6)

特公平7-46101

【第3図】



【第4図】



【第5図】



【第6図】

